

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE INDUCIDA POR OSCILACIONES DE TEMPERATURA DE CULTIVOS A ALTA DENSIDAD CELULAR DE *Escherichia Coli*

Luis Caspeta, Octavio T. Ramírez,

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Tel - Fax: (777) 3291617 - 3138811. E-mail: lcaspeta@ibt.unam.mx

Palabras clave: IPL/cl857, termo-inducción, oscilaciones, cultivo a alta densidad celular.

Introducción. Los sistemas termo-inducibles son muy utilizados para producir proteínas recombinantes en *E. coli* ya que poseen un promotor muy fuerte y eficazmente reprimido a 30°C. Esto permite el cultivo a alta densidad celular antes de inducir la síntesis de la proteína por incremento de la temperatura hasta 42°C. El incremento de la temperatura y la fuerza del promotor, sin embargo causan un fuerte impacto negativo en la fisiología de *E. coli*, que deja de crecer y sintetizar la proteína, a la vez que aumenta la síntesis de productos tóxicos (acetato, lactato, formato y succinato)¹. En este documento se reporta la termo-inducción por oscilaciones de temperatura como una alternativa no sólo para mejorar las respuestas fisiológicas y metabólicas de *E. coli*, sino también la producción de la proteína de interés.

Metodología. Cultivos a alta densidad celular de *E. coli* productora de preproinsulina humana (PPI) transformada con el sistema $\lambda_{P_L}/cl857$ fueron inducidos a temperatura Cte. de 42 °C u oscilante: 42-37 °C o 42-30 °C (figura 1). Al mismo tiempo, los cultivos fueron alimentados con cualquiera de las tres estrategias de alimentación siguientes: 1) exponencial para mantener una $\mu=0.08 \text{ h}^{-1}$ (baja), 2) lineal con $G=0.125 \text{ g/min}$ de glucosa (media) y exponencial para mantener una $\mu=0.12 \text{ h}^{-1}$ (alta)(figura 1).

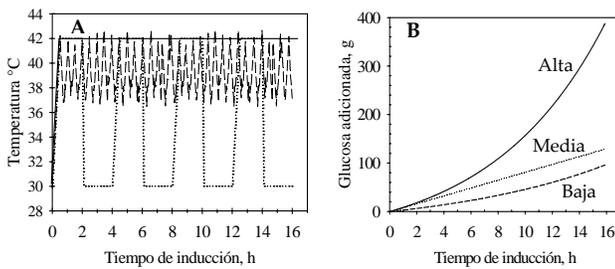


Figura 1 Estrategia de inducción (A): — Temp. Cte. 42 °C; --- Temp. Oscilante 37-42 °C; Temp. Oscilante 30-42 °C. Estrategia de alimentación (B).

Resultados. Los cultivos inducidos por oscilaciones de temperatura produjeron PPI a velocidades menores que los correspondientes a 42°C (figura 1A), por lo que fue necesario incrementar el periodo de inducción a 16 horas; tiempo durante el cual, los cultivos oscilados acumularon mayores cantidades de biomasa y PPI (figura 1B,C y D). Esto se reflejó en una menor obtención de acetato, lactato, formato y succinato en los cultivos oscilados (figura 1E, F, G y H). Los cultivos alimentados

a la tasa baja y media estuvieron limitados de glucosa, mientras que los alimentados con la tasa alta la acumularon (datos no mostrados).

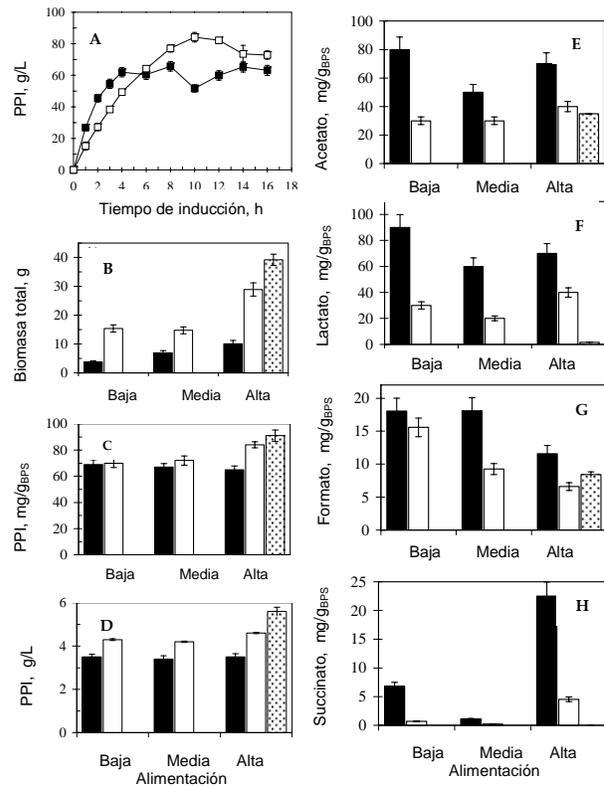


Figura 1 Cinética típica de la producción de PPI en cultivos a temperatura Cte. de 42 °C (■) y oscilante (□). Valores máximos de acumulación de biomasa y PPI (B, C y D) y acetato, lactato, formato y succinato (E, F, G y H) en cultivos inducidos a temperatura Cte. de 42 °C (barras negras) u oscilante entre 42 y 37 °C (Barras blancas) o 42 y 30 °C (barras moteadas).

Conclusiones. La inducción con oscilaciones de temperatura disminuye los efectos fisiológicos y metabólicos negativos de la inducción a 42°C. Esto se reflejó en una mayor producción de biomasa y PPI.

Agradecimientos. CONACYT: NC-230, 43243 y 46408-Z.

Bibliografía. 1. Caspeta L, Flores N, Pérez NO, Bolívar F, Ramírez OT. 2009. The effect of heating rate on *Escherichia coli* metabolism, physiological stress, transcriptional response, and production of temperature-induced recombinant protein: a scale-down study. *Biotechnol and Bioengin*, 102: 468-482.